

Phenytoinの虚血脳保護機構に関する研究

著者	黒沢 久三
号	2066
発行年	1989
URL	http://hdl.handle.net/10097/20267

氏 名（本籍） 黒 沢 久 三

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 2 0 6 6 号

学位授与年月日 平 成 元 年 2 月 22 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

最 終 学 歴 昭 和 56 年 3 月
東北大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目 Phenytoinの虚血脳保護機構に関する研究

（主 査）
論文審査委員 教授 吉 本 高 志 教授 水 柿 道 直
教授 小 暮 久 也

論文内容要旨

【目 的】

Phenytoinが優れた膜安定作用を有することは良く知られており、その主要な薬理作用は細胞内外の陽イオン濃度勾配に対する修正作用にあると考えられている。今回その作用機序解明の目的で、三主幹動脈閉塞による高度全脳虚血ラット頭頂葉皮質を用いて、phenytoinの虚血脳における遊離脂肪酸（以下FFA）、エネルギー代謝に及ぼす影響を検討し、さらに皮質 Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性、水分含有量、 Na^+ 、 K^+ 濃度の変化についても検討を加えた。

【方 法】

実験動物としては雄Wister ratを用い、高度全脳虚血は、脳底動脈を焼灼しさらに両側総頸動脈をclipすることにより作成し、血流再開はclip解除により作成した。Phenytoinは虚血開始30分前に10mg/kgを静注し、虚血5分、30分、及び30分虚血後血流再開10分、30分、60分の時点でPonten法に準じ液体窒素流入下に脳を摘出した。測定にはすべて頭頂葉皮質を用いた。Purine, pyrimidine nucleotide分析は、脳検体の湿重量を測定後、液体窒素下で粉碎し除蛋白し中和後、遠心し上清液をろ過して抽出液とし、高速液体chromatographyで測定した。またglucose, lactateは蛍光酵素法により測定した。皮質 Na^+ 、 K^+ -ATPase活性は凍結brain tissueを1 ml tris HCl bufferにてhomogenize後、その希釈液を反応液中でpreincubation し、ウアバイン添加、及び無添加のそれぞれの群に対し、tris-ATPを加えて反応を開始させ、遊離した無機リンを酸性溶液中でAmmonium molybdateにて発色させ、660nmで比色定量し、ウアバイン添加あるいは無添加の差をもって Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性とし、単位は $\mu\text{mol Pi}/\text{mg, protein}/\text{hr}$ で現した。蛋白量はLowryの方法で測定した。皮質水分含有量は、乾燥重量法により算出し、 Na^+ 、 K^+ 含有量は蛍光光度法により測定した。

【結 果】

無処置群（N群）およびphenytoin投与群（P群）においてATPは虚血負荷後急速に減少したが、虚血中から血流再開後にかけてP群が有意に高値を保っていた。AMPは両群において虚血負荷により急増し、血流再開に伴い速やかに減少したが、P群が低値を示す傾向が認められた。またN群においては、虚血負荷によりglucoseは著減し、lactateは虚血前値の9倍まで増加した。Phenytoinによりglucoseの虚血中の低下は抑えられ、血流再開後のlactateの減少が促進された。GTPは総ての時点でP群の方がN群を上廻っていた。CTP、UTPは虚血5分ではP

群がN群より有意に高値を示したが、虚血30分では両者とも極少のため測定不能であった。FFAはN群では虚血により急激に増加し、虚血5分ではすでに虚血前値の5.6倍に、30分では11.8倍と著しく増加した。しかし血流再開により速やかに減少し、特に不飽和脂肪酸の減少が飽和型よりも顕著であった。Phenytoin投与により各不飽和脂肪酸の虚血後の増加が抑制され血流再開後の回復が促進された。N群における脳皮質 Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性は虚血前値は 16.7 ± 0.5 に対し、虚血5分後は 12.8 ± 0.5 、虚血30分では 11.7 ± 0.9 と減少したが、血流再開10分後には 16.0 ± 1.6 と虚血前値に回復し以後定常値を示した。一方P群では虚血中より増加傾向を示し、血流再開10分後には 26.4 ± 0.8 と虚血前値の約1.6倍まで増加し、その後もN群に比し有意に高値を示した。N群における脳皮質水分含有量は虚血中は増加しなかったが、血流再開後10分で増加しその後はほぼ定常値を保った。この血流再開後の増加はPhenytoin投与により有意に抑えられた。脳皮質 Na^+ 、 K^+ 濃度も水分含有量と同様に虚血中は変化を示さず、血流再開により Na^+ は増加し、 K^+ は減少した。Phenytoin投与により血流再開後の Na^+ の増加、及び K^+ の減少が抑制された。

【考 察】

虚血脳においては、種々の神経伝達物質の異常放出により細胞膜の脱分極が生じ、電位依存性の Ca^{2+} チャンネルを介し、あるいは受容体依存性の Ca^{2+} チャンネルを介して細胞内に Ca^{2+} が急激に流入する。またATPの枯渇により、エネルギー依存性の Ca^{2+} -ATPaseも障害され細胞内 Ca^{2+} 濃度はさらに増加する。一方、 Na^+ 、 K^+ -ATPaseの機能低下により細胞内外の Na^+ 濃度勾配も減少するため、細胞内外 Na^+ 濃度差に依存して作動すると言われている Na^+ - Ca^{2+} 交換系も障害され、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加は一層助長される。虚血によるFFAの増加はphospholipase Cの活性化、また細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇によるphospholipase A_2 の活性化、あるいはATP減少による再アシル化の抑制によりもたらされると考えられる。したがって、本実験におけるphenytoinのFFA遊離抑制作用、即ち細胞膜構築保護作用は、phospholipase活性の抑制と再アシル化の亢進によりもたらされると考えられる。このphospholipase活性抑制の機序としては、エネルギー温存による Ca^{2+} -ATPaseの亢進、もしくは Na^+ 、 K^+ -ATPase活性亢進による細胞内外 Na^+ 濃度差の保持、さらに Na^+ - Ca^{2+} 交換系を介して、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が抑制された機序が考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

近年、脳虚血に対するphenytoinの脳保護効果が注目を集めている。一方、その作用発現機序については、ATPもしくはphosphocreatinineなどの高エネルギー化合物の減少を抑制すること、 Na^+ 、 K^+ -ATPaseを活性化すること、および脳浮腫の発現を抑制することが報告されているのみで、いまだ生化学的に詳細な検討はなされていない。本研究は、ラット一過性高度全脳虚血モデルを用いて、phenytoinの虚血脳に対する脳保護効果について、エネルギー、nucleotides、細胞膜脂質さらに細胞膜関連酵素等について生化学的に多面的に検討を加えた研究である。

その結果、phenytoinは虚血脳においてATPの減少とlactic acidosisを抑制し、GTPやCTPなどの高リン酸化合物の減少をも抑制することが明らかにされた。またphenytoinにより、従来報告されていると同様に Na^+ 、 K^+ の正常化とともに脳浮腫の軽減を証明し、同時に Na^+ 、 K^+ -ATPaseの亢進が認められることから、phenytoinの抗浮腫効果は Na^+ 、 K^+ -ATPaseの活性化を介して発現していることを明らかにしている。さらに本研究においてはphenytoinによる虚血脳の遊離脂肪酸増加抑制作用から、間接的ではあるがphenytoinの細胞内 Ca^{2+} 増加の抑制効果が明らかにされている。

以上の様に本研究によって従来明らかではなかったphenytoinの虚血脳に対する脳保護作用の発現機序が生化学的に明らかにされたと考えられる。今後、脳梗塞を始めとする脳虚血性疾患の治療に寄与するものと考えられ、本研究は博士論文に値するものと判定した。